

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04876

研究課題名(和文) カキ果実のタンニン蓄積制御機構の解明とそれを利用した完全甘ガキ育種戦略の構築

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of tannin accumulation in persimmon fruit and construction of a new innovative breeding strategy using these mechanisms

研究代表者

米森 敬三 (Yonemori, Keizo)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：10111949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：カキの近縁二倍体野生種のマメガキを用いたカキとの比較ゲノム解析から、マメガキの約915kbの範囲に日本型完全甘ガキ形質発現に関与するAST遺伝子座に対応する領域が存在することを明らかにした。さらに、トランスクリプトームと共発現ネットワーク解析により、ASTが関与するタンニン生合成は2、3の転写因子によって制御されている可能性を示した。また、中国型の完全甘ガキ形質発現に関与する遺伝子探索をトランスクリプトーム解析により実施し、糖転移酵素遺伝子やメチル基転移酵素遺伝子が関与している可能性を示唆した。これらの知見から、中国タイプの完全甘ガキも利用した新たな完全甘ガキ育種戦略を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンニンの骨格となるプロアントシアニジン(PA)はカキに限らず、ブドウ、モモ、リンゴなどのさまざまな果樹に存在しており、機能性成分として重要な化合物である。本研究ではこの生合成を制御するAST遺伝子座をほぼ特定することができ、AST遺伝子単離の道筋が示され、今後、果実のPA生合成を制御できる可能性が開けた。このことは、学術的にも実用的にも大きな意義がある。また、カキの育種においても、これまでは完全甘ガキ形質が潜性(劣性)形質であるとの固定観念から育種戦略が構築されたが、中国の完全甘ガキも利用した新育種戦略構築の可能性が示されたことの意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：The AST locus controlling persimmon astringency was determined by comparative mapping with *Diospyros lotus*, a diploid relative of *D. kaki*, as a reference. The syntenic region of AST locus was 915-kb in physical map of *D. lotus*. In addition, transcriptome and coexpression network analyses between PCNA and non-PCNA progenies revealed that AST gene affects a few transcription factors centered in the PA regulatory network. On the other hand, transcriptome analysis of the gene conferring non-astringent trait in Chinese-type PCNA persimmon indicated that the genes conferring sugar transporter, flavonoid glucosyltransferase, and flavonoid/phenylpropanoid O-methyltransferase may associate with this trait. Finally, a new innovative strategy was considered for PCNA persimmon breeding including Chinese-type PCNA persimmons.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 果樹 渋味 果実生理 育種

1. 研究開始当初の背景

カキに甘ガキと渋ガキが存在することは周知の事実であるが、園芸学的には従来、その果実の脱渋性が種子の有無によって左右される *pollination variant* タイプと種子の有無によって左右されない *pollination constant* タイプとに分類している。さらに、それぞれのタイプに甘ガキと渋ガキが存在するため、*pollination variant* の甘ガキ・渋ガキ、*pollination constant* の甘ガキ・渋ガキという4つの品種群に分類される。ただ、*constant* の甘ガキ(完全甘ガキ; PCNA)以外の品種(非完全甘ガキ; non-PCNA)は基本的には渋ガキである。すなわち、non-PCNA 品種では果実発育とともに果実中にタンニンを多量に蓄積するが、PCNA 品種ではその蓄積を果実発育初期に停止する。non-PCNA 品種群のうち、*variant* の甘ガキに属する品種群の渋味の消失は、果実内に種子が存在した場合のみ樹上でその渋味の消失がおこるが、これは種子中からエタノールやアセトアルデヒドが生成されることによって、渋味成分であるタンニン(プロアントシアジンのポリマー)が重合・不溶化することで渋味が消失するため、果実でのタンニン蓄積が発育中に停止するわけではない。これに対して、PCNA 品種群は種子の有無にかかわらず樹上で渋味が消失するが、この原因はタンニン生成が果実発育初期に停止する一方、果実肥大が進むことによってタンニン濃度が希釈されることが主たる要因となっている。

完全甘ガキは渋ガキから生じた突然変異体であり、日本において偶発的に発生したと考えられ、カキが六倍体($2n=6x=90$)という高次倍数体であること、この変異が潜性(劣性)形質であったこと、完全甘ガキが突然変異で出現した時期が比較的最近であることなどから完全甘ガキは品種分化が進まず、カキの原産地である中国、あるいは日本への伝播経路となった朝鮮半島(韓国)では在来の完全甘ガキが全く存在しないとされてきた。

しかしながらこの定説は、1983年、中国でカキの研究に携わっていた陝西省果樹研究所の王仁梓氏が、中国羅田県に完全甘ガキ‘羅田甜柿’が存在することを報告したことによって翻った。さらに興味深いことに、この‘羅田甜柿’に日本の non-PCNA 品種である‘四つ溝’や‘岩瀬度’を交雑した実生調査から、その後代に完全甘ガキ(PCNA)個体と non-PCNA 個体が分離することが明らかになった。この結果は、‘羅田甜柿’の完全甘ガキ形質は後代に質的遺伝し、さらに‘羅田甜柿’はこの完全甘ガキとなる形質発現のための遺伝子(仮に *CPCNA* 遺伝子と命名)をヘテロで有し、この *CPCNA* 遺伝子が顕性(優性)であることを強く示唆しており、日本の完全甘ガキとは、全く別の機作で完全甘ガキ形質が発現していることが明らかになった。

研究代表者らはこれまでの研究結果から、六倍体の日本の完全甘ガキ形質は、*AST/ast* 遺伝子と仮に命名した遺伝子が座乗する単一の遺伝子座によって制御されている潜性(劣性)形質であり、対立遺伝子が座乗する6本の相同染色体上の一つでも顕性(優性)遺伝子(*AST*)があれば完全甘ガキ形質は発現しないことを確認している。一方、中国の‘羅田甜柿’は、プロアントシアニン生成に関与する果実内でのフラボノイド合成系遺伝子群の発現調査から、日本の完全甘ガキでは果実発育初期にこれら遺伝子群の発現が同調的に認められなくなるのに対して、‘羅田甜柿’では、果実柔細胞に存在するタンニン細胞へのタンニン蓄積が日本の完全甘ガキ同様、果実発育初期に顕著に低下しているにもかかわらず、果実発育期間中はフラボノイド合成系遺伝子群が non-PCNA 品種と同程度の発現を保っていることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、まず、日本の完全甘ガキ形質に関与する *AST* 遺伝子座の同定を第一の目的とする。また、甘渋性を制御する候補遺伝子を特定するため、甘渋性に関与するトランスクリプトーム解析からの甘渋性発現制御に関与する遺伝子発現を調査し、そのデータを用いた甘渋性に関与する共発現ネットワークを明らかにすることも目的とした。さらに、潜性(劣性)変異として生じた完全甘ガキに集積した *ast* 遺伝子が、non-PCNA 品種内にどの程度分布しているかを調査することで、効率的に完全甘ガキ個体を得ることができる既存の品種を特定することで、新たな育種戦略構築の可能性を探ることも重要な目的である。

一方、中国の甘ガキ‘羅田甜柿’に生じた、タンニン細胞へのタンニン蓄積を妨げる機能を持つ顕性（優性）形質として完全甘ガキ性を発現する *CPCNA* 遺伝子の作用機作を明らかにし、それをカキ育種へ利用することも大きな目的である。このため、まず、日本タイプの完全甘ガキと中国タイプの完全甘ガキのタンニン蓄積制御における作用機作の差異とその相互作用について検討することを目的とし、日本タイプの完全甘ガキと中国タイプの完全甘ガキとの交雑分離個体でのトランスクリプトーム解析を実施した。次に、これまでのカキ育種においては、完全甘ガキ形質が潜性（劣性）形質であるとの固定観念から、完全甘ガキ同士の交雑による育種戦略が実施されてきたが、日本と中国の完全甘ガキ形質発現のための機作が全く異なることが明らかになってきているので、中国の完全甘ガキを利用した完全甘ガキ育種のための新規育種戦略の構築を目的とした検討を実施した。

3．研究の方法

(1) 近縁二倍体野生種マメガキとの比較マッピングによるカキの *AST* 遺伝子座の同定

これまでにカキで構築した甘渋性連鎖マーカーを利用し、その近傍領域（5R 領域）を起点として、近縁二倍体野生種であるマメガキ（*Diospyros lotus*）の BAC ライブラリーを用いた染色体歩行を実施し、BAC コンティグを構築した。また、マメガキ交雑集団 336 個体を用いて、この物理地図上の SNPs を CAPS により調査することでマメガキの遺伝地図を構築し、これをマメガキの物理地図上の位置に統合した。次に、マメガキ物理地図上でカキの甘渋性と共分離するマーカーを作出し、カキの甘渋性分離交雑集団 296 個体を用いたこれらマーカーの遺伝解析を実施し、得られた組換え個体から *AST* 遺伝子座を特定し、マメガキでのこの領域を同定した。

(2) トランスクリプトーム解析による甘渋性関与遺伝子の探索と共発現ネットワーク解析

カキの甘渋性分離交雑集団から、PCNA6 個体、non-PCNA6 個体、およびその交雑親を用いて、6月22日と7月15日に採取した果実より、RNAを抽出し、Illumina HiSeq 4000によりペアエンド100bpのリードを得た。さらに、*de novo* assemblyにより得られたコンティグにアノテーションを付与した。次に、これらのコンティグから発現変動コンティグを解析するとともに、共発現ネットワーク解析を実施した。

(3) non-PCNA 品種内での *ast* 遺伝子集積頻度とそれを利用した完全甘ガキ育種の新戦略

カキの甘渋性判別マーカー領域に存在する SSR による多型を利用することで、六倍体であるカキにおいて、*AST* 遺伝子座に存在する対立遺伝子 *AST/ast* のそれぞれのアレル数を推定することが可能である。このことを利用して、non-PCNA 127 品種のマーカー領域の PCR 増幅産物をダイレクトシーケンスし、各品種から得られたフラグメントの bp 数を解析することで、潜性（劣性）の *ast* アレルを *AST* 遺伝子座に多く持つ品種を特定し、それらを用いた新たな完全甘ガキ品種育成の可能性を検討した。

(4) 日本タイプの完全甘ガキと中国タイプの完全甘ガキのトランスクリプトーム解析

中国タイプ (CP) と日本タイプ (JP) の両者の PCNA アレルを有する“スーパー甘ガキ” (SP) が得られる分離後代において、SP 6 個体、CP 3 個体、JP 2 個体、non-PCNA (NP) 2 個体を選抜し、7月14日に採取した各タイプの果実から RNA を抽出し、Illumina HiSeq 4000 でのシーケンスに供試した。シーケンス結果は、マメガキの CDS 配列をリファレンスとして解析し、発現変動遺伝子を各群の平均発現量に基づく階層的クラスタリングによりグループ分けし、各種アミノ酸配列データベースを用いたアノテーション情報をもとに解析した。

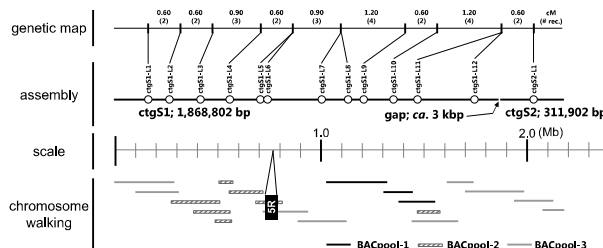
(5) 中国の完全甘ガキを利用した完全甘ガキ育種のための新規育種戦略の構築

中国タイプの完全甘ガキと日本タイプの完全甘ガキを利用した、完全甘ガキの新規育種戦略を構築するため、これまで実施したこれらが交雑親の交雑育種集団を解析し、新たな育種戦略の構築を検討した。

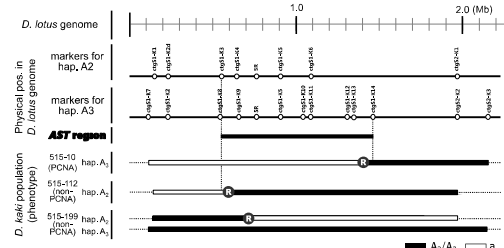
4．研究成果

(1) 近縁二倍体野生種マメガキとの比較マッピングによるカキの *AST* 遺伝子座の同定

マメガキの染色体歩行により、若干のギャップ(約 3kbp)はあるものの、最終的に 2 つのスーパーコンティグ(ctgS1 と ctgS2)にまとめることができ、13 のマーカー位置をマップした合計約 2.8Mb のマメガキゲノム配列を取得した(第 1 図)。さらに、この領域のシーケンスを利用して作出したカキの甘渋性マーカーを用い、カキの交雑育種集団 296 個体を解析することで、3 つの組換え個体を発見し、カキでの *AST* 遺伝子座領域を特定するとともに、マメガキとの比較ゲノム解析によって、マメガキでは約 915kb の範囲にカキの *AST* 遺伝子座に対応する領域が存在することを明らかにした(第 2 図)。ただ、このマメガキの領域に存在する 41 の *AST* 遺伝子候補を解析したが、PCNA/non-PCNA 間で顕著に発現変動するものは存在せず、有力な候補遺伝子を見出すことは出来なかった。



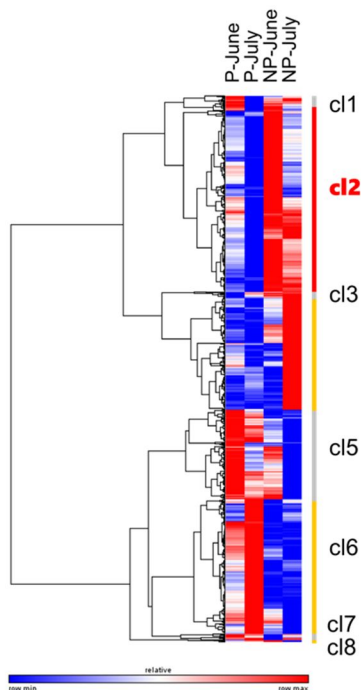
第 1 図 カキ *AST* 座とシンテニーあるマメガキゲノム領域の配列構築



第 2 図 マメガキゲノムを用いた比較マッピングによる PCNA 形質の遺伝解析

(2) トランスクリプトーム解析による甘渋性関与遺伝子の探索と共発現ネットワーク解析

合計 1,818 の遺伝子が PCNA/non-PCNA 間で異なる発現をしていることが明らかとなった。さらに、PCNA/non-PCNA 個体間の 6 月と 7 月を個別に比較してみると、6 月では 530 (PCNA において上昇する遺伝子が 192、低下する遺伝子が 338)、7 月では 1,639 (PCNA において上

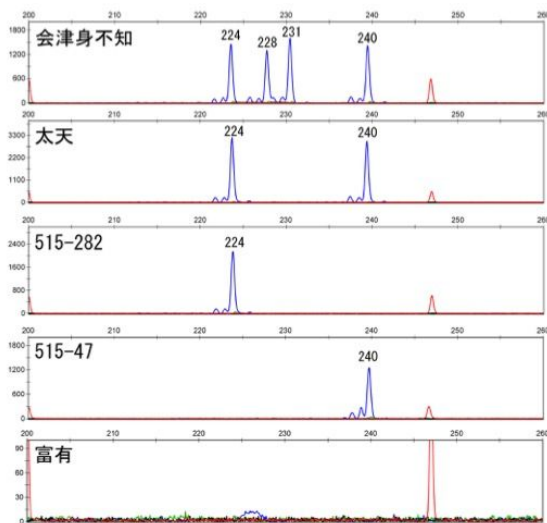


第 3 図 PCNA/non-PCNA 間で発現変動した遺伝子の階層的クラスタリング

昇する遺伝子が 703、低下する遺伝子が 936) が発現変動コンティグであった。また、これら 1,818 の遺伝子をクラスタリングしたところ、1~8 までのクラスターに分類され、このうち、特に、クラスター 2 に分類される遺伝子は、フラボノイドの合成に関係するものが多く、6 月に PCNA では発現が低下し、non-PCNA では 6 月に発現が強く、果実のタンニン蓄積パターンと一致していた(第 3 図)。さらに、共発現ネットワーク解析の結果から、*AST* はフラボノイド合成に関わる酵素をコードしている遺伝子の発現と強く関係していることが示唆された。また、*DkMYB4*、*DkMYC1*、*LOL1-like (LSD ONE LIKE 1)* の転写遺伝子がこのネットワークに強く関係していることが示され、*AST* が関与するタンニン合成制御は 2、3 の転写因子によって制御されている可能性を示唆した。

(3) non-PCNA 品種内での *ast* 遺伝子集積頻度とそれを利用した完全甘ガキ育種の新戦略

これまでに構築した甘渋性判別マーカーに存在する多型(第 4 図)を用いて、non-PCNA127 品種の遺伝子型を調査した一例を示す(第 1 表)。この結果、非完全甘ガキの交配母本においてこの多型性を調査することによって、後代における完全甘ガキの分離比をある程度予測することが可能となり、非完全甘ガキ交配母本選択の一つの指標となり得ることがわかった。



第4図 AST/ast 遺伝子座二連鎖した DNA マーカー領域の多型
赤いピークはサイズマーカー

第1表 *ast* 遺伝子を3コピー以上持つと推定した
非完全甘ガキ 17 品種

品種名	AST/ <i>ast</i> 遺伝子型	検出されたピーク数	
		AST	<i>ast</i>
エゴー	AAAaaa	3	3
油壺	AAAaaa	3	3
Ciocolatino	AAAaaa	3	3
鶴の子	AAAaaa	3	3
岡山晩御所	AAAaaa	3	3
国富	AAaaa-	2	3
吉田御所	AAaaa-	2	3
春日	AAaaa-	2	3
吉野	AAaaa-	2	3
太天	AAaaa-	2	3
Shogatsu-Italy	AAaaa-	2	3
アオサ	AAaaa-	2	3
ダイシロウ	AAaaa-	2	3
太月	AAaaa-	2	3
作州身不知	Aaaa--	1	3
天竜坊	Aaaa--	1	3
絵御所	Aaaa--	1	3

127 全品種の遺伝子型は論文 (Tree Genetics & Genomes, 2018) を参照のこと。

(4) 日本タイプの完全甘ガキと中国タイプの完全甘ガキのトランスクリプトーム解析

合計 2,516 の発現変動遺伝子が得られた。各々の発現パターンをもとに 5 つのクラス分けをし、non-PCNA (NP) で発現が高く CP と JP で発現の低いクラス (c11; 224 genes) にはフラボノイド関連と光刺激関連の遺伝子が多く含まれており、CP と JP で PA 蓄積に対する共通の制御経路を用いていることが示唆された。これら遺伝子群の SP における発現傾向は JP とよく一致しており、フラボノイド蓄積に関する *ast* と *CPCNA* の遺伝子座の相互作用はみられないことが示唆された。一方で、CP で発現が高く、JP と SP で低いクラス (c13; 1,238 genes) にはフラボノイドにアクセスできる糖転移酵素やメチル基転移酵素が見られ (第2表)、これらは CP 特異的な機構に関与している可能性が考えられた。

第2表 中国タイプ PCNA 個体で発現の高い傾向にある遺伝子群

group	GO term	FDR
sugar transporter	glucose transmembrane transporter activity	3.5E-05
	carbohydrate:proton symporter activity	1.2E-04
flavonoid GT	quercetin 3-O-glucosyltransferase activity	3.5E-05
	quercetin 7-O-glucosyltransferase activity	3.5E-05
chitin	chitin binding	4.8E-03
	chitinase activity	5.9E-03
	catechol O-methyltransferase activity	1.0E-02
flavonoid/phenylpropanoid OMT	L-dopa O-methyltransferase activity	1.0E-02
	orcinol O-methyltransferase activity	1.0E-02

(5) 中国の完全甘ガキを利用した完全甘ガキ育種のための新規育種戦略の構築

中国型完全甘ガキ × 日本型完全甘ガキの交雑および中国型完全甘ガキ × 非完全甘ガキの交雑からは中国型完全甘ガキのみが分離する。ただ、これらの交雑においては、完全に渋みを消失した個体はわずか 30%程度であり、商業生産上問題を生じる程度の渋残りを生じた。すなわち、第1代目の交雑で完全に渋みが消失し、優れた形質を持つ個体を選抜することは日本型完全甘ガキに比較して可能性が低いと思われ、第2世代またはそれ以上の交雑を行っていく必要があることがわかった。次に、日本と中国の完全甘ガキ性を併せ持つ個体のうち、これまでに結実した 11 個体について官能評価を行ったところ、9 個体の渋みは完全に消失していたが、1 個体はごくわずかに渋残りし、1 個体は明らかに渋みが残った (第3表)。この分離は、中国型完全甘ガキより渋残りの発生頻度は少ないものの、日本型完全甘ガキにおける分離と大きな差はなく、日中の完全甘ガキ遺伝子を併せ持つ個体の渋みの消失程度は日本型完全甘ガキと同等ではないかと思われた。以上、渋みの完全消失という点では日本型完全甘ガキ同士の交雑と比較して必ずしも有利とは言えないが、中国の完全甘ガキは日本の在来品種と比較して遺伝的組成が大きく異なっていることが期待できるため、近交弱勢を回避する点においては有利と考えられる。

第3表 日本型完全甘ガキ性と中国型完全甘ガキ性を合わせ持つ個体の甘渋性の分離

交雑組合せ	調査個体数	個体数 (%)			
		無	微	少	中
559-4316 × 542-126	11	9	1	1	-
559-4316の甘渋性の遺伝子型: aaaaaaかつBbbbbb (日本型完全甘ガキかつ中国型完全甘ガキ)					
542-126の甘渋性の遺伝子型: aaaaaaかつbbbbbb (日本型完全甘ガキ)					
渋残り程度は無: 渋みを全く感じない、微: ごくわずかに渋みを感じるが商業栽培上問題なし、少: 明らかに渋みを感じる、商業栽培上問題あり、中: 渋くて長く口の中に入れておけない					

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishiyama, S., N. Onoue, A. Kono, A. Sato, K. Ushijima, H. Yamane, R. Tao, and K. Yonemori	4. 巻 87
2. 論文標題 Comparative mapping of the ASTRINGENCY locus controlling fruit astringency in hexaploidy persimmon (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) with the diploid <i>D. lotus</i> reference genome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 316-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.OKD-140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Onoue, N., S. Kobayashi, A. Kono, and A. Sato	4. 巻 14
2. 論文標題 SSR-based molecular profiling of 237 persimmon (<i>Diospyros kaki</i> Thunb.) germplasms using an ASTRINGENCY-linked marker	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tree Genetics & Genomes	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11295-018-1239-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama, S., N. Onoue, A. Kono, A. Sato, K. Yonemori, and R. Tao	4. 巻 247
2. 論文標題 Characterization of a gene regulatory network underlying astringency loss in persimmon fruit	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 733-743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-017-2819-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西山総一郎・尾上典之・河野淳・佐藤明彦・田尾龍太郎・米森敬三
2. 発表標題 クリプトーム解析による日本タイプ完全甘と中国タイプ完全甘のPA蓄積制御メカニズムの比較
3. 学会等名 園芸学会平成31年度春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山総一郎・尾上典之・河野淳・佐藤明彦・米森敬三・田尾龍太郎
2. 発表標題 カキの果実発達を制御する遺伝子ネットワーク
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山総一郎・藏本晃栄・尾上典之・河野淳・佐藤明彦・米森敬三・田尾龍太郎
2. 発表標題 カキ甘渋性決定遺伝子座の多様性解析
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山総一郎・尾上典之・河野淳・佐藤明彦・牛島幸一郎・山根久代・田尾龍太郎・米森敬三
2. 発表標題 カキ甘渋性決定遺伝子座とシンテニィのあるマメガキゲノム領域の解析
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山総一郎・尾上典之・河野 淳・佐藤明彦、米森敬三、田尾龍太郎
2. 発表標題 カキ甘渋性に関する共発現ネットワーク解析
3. 学会等名 園芸学会平成29年度春季大会研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishiyama, S., A. Kono, A. Sato, K. Yonemori, and R. Tao
2. 発表標題 Transcriptome analysis for astringency in persimmon fruit
3. 学会等名 VI International Symposium on Persimmon (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yonemori, K., S. Nishiyama, A. Kono, N. Onoue, and A. Sato
2. 発表標題 Differential expression analysis of the genes conferring non-astringent trait at the two different loci in Japanese- and Chinese-type pollination constant non-astringent (PCNA) persimmon
3. 学会等名 VI International Symposium on Persimmon (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 明彦 (Sato Akihiko) (30355440)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・ユニット長 (82111)	
研究分担者	神崎 真哉 (Kanzaki Shinya) (20330243)	近畿大学・農学部・准教授 (34419)	
研究分担者	山根 久代 (Yamane Hisayo) (80335306)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	2016年度、2017年度の2年間